

**THIS PAGE IS INSERTED BY OIPE SCANNING
AND IS NOT PART OF THE OFFICIAL RECORD**

Best Available Images

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

BLACK BORDERS ✓

TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT

BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED PHOTOS HAVE BEEN RENDERED INTO BLACK AND WHITE

VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS

UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE THE BEST AVAILABLE
COPY. AS RESCANNING *WILL NOT*
CORRECT IMAGES, PLEASE DO NOT
REPORT THE IMAGES TO THE
PROBLEM IMAGE BOX.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-57892

(P 2 0 0 1 - 5 7 8 9 2 A)

(43) 公開日 平成13年 3 月 6 日 (2001. 3. 6)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I		テーマコード (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNA	A
C12Q 1/68		C12Q 1/68		A

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全21頁)

(21) 出願番号 特願2000-182884 (P 2000-182884)

(22) 出願日 平成12年 6 月 19 日 (2000. 6. 19)

(31) 優先権主張番号 0 9 / 3 3 5 2 1 8

(32) 優先日 平成11年 6 月 17 日 (1999. 6. 17)

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 595117091

ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー

BECTON, DICKINSON A
ND COMPANY

アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 07
417-1880 フランクリン・レイクス
ベクトン・ドライブ 1

(74) 代理人 100099623

弁理士 奥山 尚一 (外 2 名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸配列変異を検出するための方法とオリゴヌクレオチド

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 検出プライマーを使用して、関心のある核酸配列の配列変異を検出して同定するための方法の提供。

【解決手段】 プライマーの3' 末端が標的と完全にハイブリダイゼーションしない場合、DNAポリメラーゼによるプライマー伸長効率の低さを、検出プライマーと標的との間に診断用ミスマッチが起こる部位に位置する標的のヌクレオチドを識別又は同定するための手段として使用するために適合させることができる。検出プライマーは関心のある配列とハイブリダイゼーションし、ポリメラーゼによって伸長される。検出プライマーの伸長効率は、標的の配列変異の存在及び/又は正体の指標として検出される。本方法は、検出プライマーの3' 末端又は3' 末端近傍に位置するヌクレオチドのミスマッチを使用して、関心のあるヌクレオチド配列と標的の同じ部位に生じてよい第2のヌクレオチドとを識別する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 標的における単一ヌクレオチド多型を検出するための方法であって、

- a) 検出プライマーおよび第2のプライマーを標的にハイブリダイゼーションさせて、ポリメラーゼによる第2のプライマーの伸長が標的配列から検出プライマーを置換するステップと、ここで、検出プライマーが、検出プライマーの3'末端ヌクレオチドまたは3'末端ヌクレオチドから約1~4ヌクレオチドの単一ヌクレオチド多型のための診断用ヌクレオチドを含み、
- b) ポリメラーゼによって検出プライマーおよび第2のプライマーを伸長して、置換された検出プライマー伸長産物を生成するステップと、
- c) 検出プライマーの伸長効率を求めるステップと、
- d) 検出プライマーの伸長効率に基づいて、単一ヌクレオチド多型の有無を検出するステップとを含む方法。

【請求項2】 単一ヌクレオチド多型が、検出プライマーを使用して同定される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 検出プライマーが、標的配列と診断用でないミスマッチを形成するヌクレオチドをさらに含む請求項1に記載の方法。

【請求項4】 標的における単一ヌクレオチド多型を検出するための方法であって、等温核酸増幅反応において、

- a) 検出プライマーを標的にハイブリダイゼーションするステップと、ここで、検出プライマーが、標的配列と相補的である検出プライマーの3'末端ヌクレオチドから1~4ヌクレオチドの単一ヌクレオチド多型の診断用ヌクレオチドを含み、
- b) 検出プライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長により標的を増幅するステップと、
- c) 検出プライマーの伸長効率を求めるステップと、
- d) 検出プライマーの伸長効率に基づいて単一ヌクレオチド多型の有無を検出するステップとを含む方法。

【請求項5】 単一ヌクレオチド多型が、検出プライマーを使用して同定される請求項4に記載の方法。

【請求項6】 検出プライマーが、標的配列と診断用でないミスマッチを形成するヌクレオチドをさらに含む請求項4に記載の方法。

- 【請求項7】 a) プライマーの伸長が標的配列からオリゴヌクレオチドを置換するように、プライマーのハイブリダイゼーション部位から下流の標的核酸の内部セグメントにハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列と、
- b) 標的核酸中に存在する単一ヌクレオチド多型のための診断用である3'末端ヌクレオチドまたは3'末端ヌクレオチドから約1~4ヌクレオチドとを含むオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 診断用ヌクレオチドの約1~15ヌクレオチドの間に診断用でないヌクレオチドをさらに含む請求

項7のオリゴヌクレオチド。

【請求項9】 等温核酸増幅反応の増幅プライマーであるオリゴヌクレオチドであって、

- a) 標的に相補的である3'末端ヌクレオチドと、
- b) 増幅される標的に存在する可能性のある単一ヌクレオチド多型の診断用ヌクレオチドである3'末端ヌクレオチドから約1~4ヌクレオチドとを含むオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

10 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸の配列変異を検出し、同定するための方法に関する。

【0002】

【従来の技術】個体間および種間のDNA配列の変異を検出し、同定することは、進化的な関係、先天性疾患、後天性疾患および分子遺伝学の他の面に新たな知見を提供してきた。配列変異の分析は、通常、配列変異の結果として制限断片長の変化を利用する制限酵素断片長多型(RFLP)を分析することによって実施されている。RFLP分析は、適当なプローブを用いて、ゲルおよびサザンブロット法で制限断片のサイズ分離を必要とする。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】この技法は時間がかかり、労働集約的で、配列の変化により制限部位が新たに形成されない場合、または制限部位が除去されない場合には使用することができない。

- 【0004】さらに最近では、DNAの配列分析を容易にするためにPCRが使用されている。例えば、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドが、疾患診断のためのPCR産物のドットプロットをプローブするために使用されている。点突然変異が制限部位を形成または除去する場合には、PCR産物の切断を遺伝子診断(例えば、鎌状赤血球貧血)に使用することができる。配列変異を分析するための一般的なPCR技術も報告されている。S. Kwokら(1990、Nucl. Acids Res. 18:999-1005)は、配列変異を受けないと思われるHIVを増幅するためのプライマーを設計する目的のために、種々のプライマーと鋳型とのミスマッチのPCRに対する影響を評価した。この著者らは、自分達の研究は対立遺伝子特異的な増幅のためのプライマーの開発を容易にすると考えられるとも考えた。S. Kwokらは、PCRプライマーの3'末端ミスマッチは、種々の結果を生じたことを報告している。一方、3'のTの末端ミスマッチを除いて、3'末端がプライマーの最後の4つのヌクレオチド内に第2のミスマッチを伴うと、一般に、増幅産物が劇的に減少した。この著者らは、1個の3'末端から1ヌクレオチドのミスマッチ(N-1)、3'末端から2ヌクレオチドのミスマッチ(N-2)または3'末端から3ヌクレオチドのミスマッチ(N-3)が、PCRによる増幅効率に全く影響を与えなかったことを報告している。
- 50 C. R. Newtonら(1989、Nucl. Acids Res. 17:2503-251

6) は、ゲノムDNAにおける任意の既知の変異を分析するためのPCRの改善を報告している。この系はAmplification Refractory Mutation SystemまたはARMSと呼ばれ、対立遺伝子特異的PCRプライマーを使用する。PCR増幅プライマーの3'末端ヌクレオチドは、対立遺伝子特異的であるので、それが標的とミスマッチである場合には、増幅プライマーとして機能しない。この著者らは、増幅プライマーの3'末端近傍の追加のミスマッチが、対立遺伝子識別を改善する場合もあることも報告している。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、検出プライマーを使用して、関心のある核酸配列の配列変異を検出して、同定するための方法を提供する。検出プライマーは関心のある配列にハイブリダイゼーションし、3'末端が効率的に標的とハイブリダイゼーションする場合に、ポリメラーゼによって伸長される。本発明の方法は、評価対象の標的配列（例えば、遺伝子の変異型対立遺伝子）と第2の核酸配列（例えば、同じ遺伝子の野生型対立遺伝子）との間の1個のヌクレオチドの違いを検出し、同定するのに特に好適である。その理由は、本発明の方法では、検出プライマーの3'末端または3'末端近傍のヌクレオチドミスマッチを使用して、第1のヌクレオチドと、標的のその部位に生じうる第2のヌクレオチドとを識別するからである。プライマーの3'末端または3'末端近傍の1つ以上のヌクレオチドが標的と効率的にハイブリダイゼーションしない場合のDNAポリメラーゼによるプライマー伸長効率の低下を、検出プライマーの1つ以上のヌクレオチドがハイブリダイゼーションする部位の標的のヌクレオチドを識別または同定するための手段として使用するために適合することができる。選択した標的にハイブリダイゼーションする選択した検出プライマーの伸長反応効率は、伸長反応において生成される伸長された検出プライマーの相対量を求めることによってモニターされる。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、標的核酸に含まれる核酸配列の変異を検出するのに有用である。特に、本発明の方法は関心のある核酸配列（例えば、対立遺伝子）における単一ヌクレオチド多型（single nucleotide polymorphism; SNP）を検出することと、任意選択的に、このようなSNPまたは対立遺伝子を同定することとに関する。このようなヌクレオチド配列変異は、標的配列の増幅中に分析対象の試料中で直接検出され得る。本発明の方法は、相補的な配列にハイブリダイゼーションするプライマーの3'末端または3'末端近傍にミスマッチが存在する場合に、DNAポリメラーゼによるプライマーの伸長効率が相対的に悪いことに基づいている。検出プライマーが標的核酸の第1の対立遺伝子にハイブリダイゼーションされる場合には、1つ以上のミスマッチが起き、検出プライマーが標的核酸の第2の対立遺伝子に

ハイブリダイゼーションされる場合には、正しい塩基対形成が生じるように、検出プライマーの3'末端または3'末端近傍のヌクレオチドを選択することによって、検出プライマーを2つの異なる対立遺伝子にハイブリダイゼーションする場合におけるポリメラーゼによる伸長効率の差を使用して、標的核酸がどちらの対立遺伝子を含有するかを示すことができることを出願人らは見いだした。多数の対立遺伝子の任意の1つが存在しうる場合には、各々3'末端または3'末端近傍に異なるミスマッチを有する可能性のある多数の検出プライマーを、分析に使用することができる。最も効率的に伸長される検出プライマーは、対立遺伝子の正体となる（すなわち、分析対象の標的配列に存在するヌクレオチドの正体）。例えば、同定される対立遺伝子の部位にA、G、CおよびTを含む1組の検出プライマーを関心のある標的にハイブリダイゼーションし、伸長する場合、対立遺伝子の正体は、ポリメラーゼによって最も効率的に伸長されたシグナルプライマーのヌクレオチドの相補鎖である。1つの反応で対立11遺伝子を同定するためには、多数の検出プライマーが反応中に存在し、検出プライマーの各々には別個に検出され得る標識（例えば、検出プライマーの混合物中で識別され得る異なる蛍光団）が結合されている。

【0007】さらに詳細には、本発明の検出プライマーは、関心のある標的配列にハイブリダイゼーションし、等温増幅反応中にDNAポリメラーゼによって伸長されるオリゴヌクレオチドである。検出プライマーのヌクレオチド配列は、関心のある標的核酸に特異的にハイブリダイゼーションし、検出プライマーの大多数が典型的なワトソン-クリック型に正しく標的と塩基対形成するように選択される。しかし、3'末端または3'末端近傍の検出プライマーのヌクレオチド配列は、標的配列の異なるSNPまたは対立遺伝子（診断用ヌクレオチド位置）を識別するように、選択される。診断用ヌクレオチドは、選択した標的の特定の対立遺伝子の分析（例えば、存在または同定）を可能にする検出プライマー中のヌクレオチドと規定される。すなわち、標的配列の第1の単一ヌクレオチド変異（例えば、遺伝子の野生型または変異型対立遺伝子）とハイブリダイゼーションすることにより、SNPの部位に正しいワトソン-クリック型塩基対が形成され、検出プライマーが標的配列の同じ部位に第2のヌクレオチド変異（例えば、遺伝子の第2の変異型対立遺伝子）を含有する標的とハイブリダイゼーションすることにより、検出プライマーと標的との間にミスマッチが形成されるように、検出プライマーの3'末端の配列は選択される。プライマーのミスマッチが増幅反応においてどのように対立遺伝子の識別を可能にするかの一例として、診断用ヌクレオチド位置にC残基を有する検出プライマーが、検出プライマーの効率的な伸長を示す大きいシグナルを形成する場合、これは標的対立遺伝子がGで

あることを示す。一方、伸長された検出プライマーのシグナルが低い場合には、標的対立遺伝子がGでないことを示す。1個だけのSNPが標的中に生じていることが予想される場合には、1個の検出プライマーを使用して、分析を実施すると、1個の対立遺伝子の同定が可能になる。同じヌクレオチド位置に多数の異なる対立遺伝子が存在する場合には、単一の検出プライマーがその検出プライマーが診断用となる対立遺伝子の有無に関する情報を提供する。多数のSNPが考えられる場合に対立遺伝子を同定するためには、SNP部位にA、TおよびGを含有する多数の検出プライマーを使用して標的中の対立遺伝子を同定することができる。すなわち、検出プライマーの伸長産物に関連する高いシグナルを形成する検出プライマーは、標的のSNPの相補鎖であるヌクレオチドを含有する。本発明では、検出プライマーのミスマッチと思われるヌクレオチドが3'末端または3'末端から約1~4ヌクレオチド残基（すなわち、N位、N-1位、N-2位、N-3位またはN-4位）に置かれている。

【0008】予期しないことであったが、検出プライマーの配列に、関心のある対立遺伝子の検出または同定を目的としない第2のミスマッチを置くことが好ましい場合が多いことも見いだされた。第2の診断用でないミスマッチは、同定対象のSNPの識別レベルを改善することが多く、好ましくは、診断用でないミスマッチが分析対象の標的対立遺伝子と関係なく起きるように、変化することが予想されない標的配列領域に基づいて選択される。第2のミスマッチは、対立遺伝子の識別に正の影響を生ずるが、診断用ヌクレオチドの近傍にある場合に最も大きな改善を提供する検出プライマーの任意の部位に起きてよい。これは、一般に、診断用ヌクレオチドから1~15ヌクレオチドまでの範囲であるが、好ましくは、検出プライマーの診断用ヌクレオチドの約1~5ヌクレオチドの範囲である。診断用でないミスマッチが診断用ミスマッチから離れると、対立遺伝子の識別に対して与える影響が減少するという観察に基づいて、第2の診断用でないミスマッチは検出プライマーのT_nに対して一般的な影響ではなく、位置的な影響を与えると出願人は考えている。当業者は、検出プライマーを使用して対立遺伝子の識別に対する影響を評価することにより、検出プライマー中の診断用でないミスマッチの適切な位置を通常の実験によって決定することができる。

【0009】ミスマッチは、オリゴヌクレオチドの鎖長が短い方が、長いものよりもハイブリダイゼーションに対して大きい影響を与えることは周知であるが、本発明の検出プライマーを使用した対立遺伝子の識別をT_nに関連するハイブリダイゼーションの影響に全く帰すことができない。例えば、診断用ヌクレオチドの位置を検出プライマーの3'末端から分子の中心部に移動すると、識別が実質的に低下する。対立遺伝子を識別する唯一の機序がT_nに関連したハイブリダイゼーション効率である場

合には、この移動は対立遺伝子の識別を低下しないで増加するはずである。発明者らは、正反対の事象、すなわち、診断用ヌクレオチドが検出プライマーの3'末端近傍にある場合に、対立遺伝子が最適に識別されることを観察した。また、発明者らは、3'末端に存在しない診断用ミスマッチと以下に記載する追加の診断用でないミスマッチとを含有する検出プライマーが、マッチした検出プライマーとミスマッチした検出プライマーとの間のハイブリダイゼーション効率の単純な差が最小であることが予想される場合には、比較的長い検出プライマーにおける対立遺伝子の識別が良好になることを発見した。診断用でないヌクレオチドは、診断用ヌクレオチドの近傍に位置する場合には、識別を改善し、15ヌクレオチドより大きく離れて配置される場合には、ほとんど影響がないということは、さらに、ハイブリダイゼーション効率の改良以外の要因が本発明による対立遺伝子識別に関係することを示唆している。

【0010】本発明の検出プライマーは、一般に、鎖長約12~50ヌクレオチドである。1個の診断用ヌクレオチドだけが存在する場合には、検出プライマーは、好ましくは、鎖長約12~24ヌクレオチドであり、さらに好ましくは鎖長約12~19ヌクレオチドである。診断用ヌクレオチドと診断用でないヌクレオチドとを含有する検出プライマーは、約15~20ヌクレオチドの鎖長が好ましく、15~36ヌクレオチドがさらに好ましく、18~24ヌクレオチドが最も好ましい。

【0011】検出プライマーは本発明の等温増幅方法において種々の方法で使用され得る。第1の実施態様では、検出プライマーは核酸増幅反応に使用するための増幅プライマーであってもよい。すなわち、検出プライマーは増幅反応において2つの機能、すなわち関心のある標的配列の増幅と標的配列内のSNPの検出または同定（「検出/増幅プライマー」）を実施することができる。SDA、3SR、NASBA、TMAおよび他の等温増幅反応のための増幅プライマーの構造と機能は当技術上周知であり、本明細書に教示されているように3'末端ヌクレオチド配列を選択することによって、本発明の検出プライマーとして使用するためにこれらの増幅プライマーを適合させることは、当技術範囲内である。PCRでは、増幅反応を駆動させる増幅プライマーには特定の配列または構造は必要ない。このため、PCRの増幅プライマーは、一般に、標的結合配列だけからなる。しかし、他の増幅反応では、増幅プライマーは、増幅反応が生じるのに必要な特殊な配列と構造を含む。例えば、3SRおよびNASBAのための増幅プライマーは、5'末端近傍にRNAポリメラーゼプロモーターを含む。プロモーターは、標的配列に結合され、標的の多数のRNAコピーを転写させることによって増幅反応を起こさせる働きをする。SDAの増幅プライマーは、5'末端近傍に制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含む。制限部位は、標的配列に結合され、半

改変され、増幅反応中に2本鎖になる。一旦2本鎖になると、制限部位のニッキングにより、ポリメラーゼによる標的の多数のコピーの合成および置換を可能にすることによって、SDA反応が進行する。

【0012】検出/増幅プライマーが標的の3' 末端または3' 末端近傍とミスマッチを形成する場合には、増幅効率が低下し、伸長された検出/増幅プライマー（すなわち、増幅産物またはアンプリコン）を検出する際に、増幅効率の低下に伴ってシグナルが低下することが、検出/増幅プライマーとの診断用ミスマッチが生じた標的のヌクレオチド位置にSNPが存在することまたはその正体を示す。検出/増幅プライマーが伸長された場合に、シグナル変化を形成する標識で検出/増幅プライマーを標識する場合には（以下に考察）、伸長産物は標的の増幅が生じるにつれて、リアルタイムで検出することができるので、伸長産物を増幅後に検出する追加のステップが必要ない。SDAなどの等温増幅反応では、検出/増幅プライマーのN-1またはN-2の単一ミスマッチは、一般に、3' 末端の単一ミスマッチより対立遺伝子識別の効率がよいことがある。従って、検出プライマーが等温増幅反応の増幅プライマーである場合には、3' 末端ミスマッチは好ましくない。これは、報告によるとPCR増幅プライマーの3' 末端ミスマッチにより対立遺伝子識別が十分であった温度サイクル型の増幅反応に関する従来技術の教示とは異なる（Kwokら、上記を参照）。しかし、PCRに関する従来技術の教示とも異なり、本発明の等温増幅方法では、特に任意の第2の診断用でないミスマッチが含まれる場合には、N-1からN-4における検出/増幅プライマーと相補的な3' 末端ヌクレオチドのミスマッチにより、対立遺伝子識別は優れた結果となる。

【0013】別の好ましい実施態様では、米国特許第5, 547, 861号に教示されているように、検出プライマーを等温増幅反応においてシグナルプライマー（検出プローブとも呼ばれる）として使用する。この文献は、その開示内容を参照することにより本明細書に組み入れられるものとする。増幅反応では、増幅プライマーの伸長がシグナルプライマーおよびその伸長産物と置き換わるように、シグナルプライマーは、増幅プライマーの下流の標的配列とハイブリダイゼーションする。伸長後、シグナルプライマーは、第2の増幅プライマーのハイブリダイゼーション部位である下流配列を含む。第2の増幅プライマーは、伸長したシグナルプライマーとハイブリダイゼーションし、その相補鎖の合成をプライムする。これらの2本鎖二次的増幅産物の生成は、標的配列の存在を示すものとして検出できるだけでなく、本発明の方法では、検出プライマー（検出/シグナルプライマー）に特徴的な配列を有するシグナルプライマーは標的配列内のSNPの検出および/または同定も容易にする。この実施態様では、3' 末端（N）またはN-1からN-4のいずれかの診断用ミスマッチが優れた対立遺伝子識別を提供する。特

に、マッチしたプライマーとミスマッチしたプライマーとの間のハイブリダイゼーション効率の差が小さくなる長い検出プライマーを使用する場合には、先に記載されているように第2の診断用でないミスマッチを使用して対立遺伝子識別をさらに改善する。3' 末端の診断用ミスマッチだけでは検出/増幅プライマーの対立遺伝子識別が不良であったので、この所見は予想されなかった。検出/シグナルプライマーが伸長される場合にシグナルの検出可能な変化を生ずるレポーター基で検出/シグナルプライマーを標識する場合には、等温増幅反応において検出/シグナルプライマーを使用すると、リアルタイム（増幅と同時に）での伸長産物の検出およびSNPの分析が可能になる。または、検出/シグナルは増幅後またはSNPを検出するために標的を増幅することなく使用されてもよい。この実施態様では、第2のプライマーの伸長が検出/シグナルプライマーおよび生成され得る任意の検出/シグナルプライマー伸長産物と置き換わるように、検出シグナルプライマーは、ポリメラーゼによって伸長され得る任意のプライマーの下流の標的にハイブリダイゼーションされる。

【0014】検出/増幅プライマーの3' 末端の診断用ミスマッチと比較したとき、検出/シグナルプライマーの3' 末端の診断用ミスマッチで得られた異なる結果は少なくとも部分的には動態学的な影響による場合があると出願人らは仮定している。シグナルプライマーが、ハイブリダイゼーションされる標的において効率的に伸長されない場合には（例えば、標的がミスマッチを含有する場合）、それは上流の増幅プライマーの伸長によって、鋳型から速やかに置き換えられる。シグナルプライマーが効率的に伸長される場合には、シグナルプライマーが標的から置き換えられる前に伸長が起きる。すなわち、（一般に、完全にマッチしていて、効率的に伸長される）上流の増幅プライマーは、検出/シグナルプライマーに伸長の「時間制限」を与える。一方、等温増幅反応における増幅プライマーは、一般に、等温増幅反応の別の成分によって、または温度サイクルによって、伸長の時間制限を与えない。従って、十分な時間が利用できれば、伸長反応の効率が悪くても、検出/増幅プライマーは最終的には伸長され得る。3' 末端ミスマッチを有する検出/増幅プライマーを等温増幅反応に使用する場合には、この現象は対立遺伝子の識別を低下されると思われる。しかし、米国特許第5, 270, 184号に記載されているように、第2のプライマーが増幅プライマーの上流に結合する場合には（例えば、「外部」または「パンパー」プライマー）、時間制限が増幅の前に与えられる場合がある。この場合には、上流のプライマーの伸長が増幅プライマーの伸長に時間制限を与える。増幅プライマーの伸長が3' 末端または3' 末端近傍のミスマッチによって遅延される場合には、増幅プライマーは伸長される前に上流プライマーの伸長によって置き換えられること

がある。置き換わる上流プライマーが存在する場合には、マッチした標的とミスマッチした標的とを識別する増幅プライマーの能力をこの動態学的な影響が増幅の前に増大することが予測される。しかし、ミスプライミングが生ずる場合には、標的のミスマッチを正しくする増幅プライマーの能力により、元の標的の間違ったコピーではない増幅産物が得られる。増幅プライマーは、アンプリコンを生成した増幅プライマーと完全にマッチしたアンプリコンを生成するので、対立遺伝子識別の基礎は排除される。一方、このような「補正」はシグナルプライマーでは生じない。

【0015】検出プライマーのハイブリダイゼーションにより、分析対象である標的の診断用ヌクレオチド位置に正しく塩基対形成されるか、又は、ミスマッチが形成されるかどうかは、DNAポリメラーゼによる検出プライマーの相対的な伸長効率を評価することによって決定される。この決定は定量的であっても定性的であってもよい。検出プライマーの伸長は3'末端または3'末端近傍にミスマッチが存在する場合には、効率が悪く、3'末端全体が標的と正しく塩基対形成されている場合には、効率が低い。すなわち、検出プライマー産物は3'末端近傍の正しい塩基対形成では、比較的より長く伸長される。伸長された検出プライマーは、一般に、検出プライマーに結合した標識によって検出される。標識は直接検出可能であっても、当技術上周知のその後の反応後のみ、検出可能であってもよい。または、検出プライマー自体は未標識で、標識されたプローブにハイブリダイゼーションすることによって、伸長産物が検出されてもよく、またはゲル上で可視化するために臭化エチジウムで処理するなどのその後の反応で検出されてもよい。伸長されていないプライマーに関連するシグナルの量と比較したときの、伸長された検出プライマーに結合された標識からの相対的シグナル量が、生成された伸長産物量および伸長反応効率の指標となる。

【0016】増幅反応中に生成された伸長された検出プライマー産物の存在または量を求めるための当技術上周知の多数の技法が存在する。まず、例えば、ゲル電気泳動によってまたは伸長された検出プライマーを固相に選択的に捕獲することにより、伸長されていない検出プライマーから分離することによって、サイズの増加により検出プライマーの伸長産物を検出および/または定量することができる。しかし、好ましい実施態様では、検出プライマーは検出プライマーが伸長された場合にのみ検出され得るレポーター基または検出プライマーが伸長された場合のみ、シグナルの変化を生ずる標識で標識される。このような標識の一例は、標識が結合したオリゴヌクレオチドが標的配列にハイブリダイゼーションして伸長された場合に、蛍光極性の変化を受ける蛍光染料である。シグナルプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長を検出するために蛍光極性の変化を使用する方法

は、米国特許第5,800,989号、米国特許第5,593,867号および米国特許第5,641,633号に記載されている。これらの特許は、シグナルプライマーが2本鎖になって（標的配列上での伸長の成功によって可能になる）標的増幅を検出できる場合に生ずる蛍光極性の変化を使用することについて記載している。本発明の方法では、蛍光標識した検出プライマーの蛍光極性の変化を使用して、伸長効率を評価することができ、増幅対象の標的中のSNPを検出または同定することができる。

- 10 【0017】プライマーの伸長を示すシグナルの検出可能な変化を受ける標識の第2の例は蛍光ドナー/消光剤の染料対である。消光剤染料は蛍光であってもよいが、蛍光である必要はない。ドナーと消光剤が非常に近接している場合には、ドナーの蛍光は消光される。染料が離れた位置に移動されると、消光は起こりにくく、ドナーの蛍光は増加する。標的が存在する場合に染料間の距離を増加するための種々の機序により、このようなドナー/消光剤染料対を使用して標的核酸を検出することは、米国特許第5,846,726号、米国特許第5,691,145号および欧州特許第0 881 302号に記載されている。シグナルプライマー増幅系および伸長され得るプライマー/プローブの両方にドナー/消光剤染料対を使用して、増幅されていない標的または増幅後の標的を検出することが開示されている。本発明では、当技術上周知であるように、本発明の検出プライマーをドナー/消光剤染料対で標識して、標的中のSNPを検出および/または同定するために使用してもよい。

- 30 【0018】前述の参照文献に開示されているように、本質的にいかなる核酸増幅反応に使用するための種々のプライマー伸長検出系が周知である。それらは、プライマー伸長を迅速に、リアルタイムで検出する等温増幅反応に特に有用である。本発明の方法では、検出プライマーは、前述の参照文献に教示されているように、蛍光レポーター基を含有する化合物および蛍光極性または蛍光消光の変化によって検出される伸長産物で標識されてもよい。または、これらの参照文献に教示されているように、検出プライマーは未標識で、伸長産物は標識されたプライマー/プローブにハイブリダイゼーションされ、プライマー/プローブの蛍光極性または蛍光消光の変化を検出することによって検出されてもよい。

【0019】

【実施例】例1

標識された検出プライマーを使用した単一ヌクレオチド多型の同定を実証するために、1個のヌクレオチドだけが異なるモデル標的オリゴヌクレオチドを、以下のように生成した。1カ所を除いて同一の配列を含有する4つのオリゴヌクレオチドを合成した。オリゴヌクレオチドの変異位置は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) またはチミン (T) を含有した。4つの変異型オリゴヌクレオチドの3'末端に相補的な5番目のオリゴヌク

レオチドも合成した。4つの変異型オリゴヌクレオチドの各々を5番目のオリゴヌクレオチドと混合し、沸騰した湯浴中で2分間加熱し、乾式恒温槽中で37℃で平衡化した。次いで、アニーリングした変異型オリゴヌクレオチドおよび5番目のオリゴヌクレオチドを、14 mMのデオキシシチジン α -(0-1-チオ)-トリホスフェート、2 mMのデオキシアデノシン三リン酸、2 mMのデオキシグアノシン三リン酸、2 mMのチミジン三リン酸および40単位のエキソヌクレアーゼ欠損クレノウDNAポリメラーゼを含むプライマー伸長反応液中で伸長した。プライマー伸長反応を37℃において45分間進行させ、その後、乾式恒温槽で70℃において10分間反応液をインキュベーションすることによって、クレノウDNAポリメラーゼを失活した。こうすることによって、1箇所のヌクレオチド位置だけが異なる4つの2本鎖DNAモデル標的配列が生成された。この標的をA標的、C標的、G標的およびT標的と命名した。

【0020】3'末端を有するモデル標的配列と多型ヌクレオチド位置においてハイブリダイゼーションする、第2の組の4つのオリゴヌクレオチドも検出プライマーとして使用するために合成した。4つの検出プライマーの各々は、3'末端(N、診断用ヌクレオチド)に4つのヌクレオチド塩基(A、C、GまたはT)の1つおよびモデル標的配列とミスマッチを形成する3'末端から3塩基目の位置に「A」ヌクレオチドを有した。1 μ Mの検出プライマー、25単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)、175 μ Ciの α -[32 P]-アデノシン三リン酸(32 P-ATP)および1 \times 濃度のPNK緩衝液を含有する25 μ lの反応液中で4つの検出プライマーを放射性標識した。標識反応は、PNK以外の成分を含有する溶液にPNKを添加することによって開始された。反応液を37℃において20分間インキュベーションし、次いで沸騰した湯浴中で加熱してPNKを失活した。

【0021】検出プライマーは、増幅反応中でシグナルプライマーとして使用した。標識した検出プライマー調製物の各々の5 μ l量を各標的の別個のSDA反応液に添加した(40 mMのKH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.6; 10%v/vのグリセロール; 7.5 mMの酢酸マグネシウム; 0.5 μ Mの各増幅プライマー; 1.4 mMのデオキシシチジン α -(0-1-チオ)-三リン酸; 0.5 mMのデオキシアデノシン三リン酸; 0.5 mMのデオキシグアノシン三リン酸; 0.5 mMのチミジン三リン酸; 0.1 mg/mlウシ血清アルブミン; 0.5 μ gヒト胎盤DNA、10'のA、C、GまたはT標的DNA分子; 100 nMの放射性標識検出プライマー; 160単位のBsoBI制限エンドヌクレアーゼおよび25単位のBst DNAポリメラーゼラジフラグメントを含有する50 μ l)。BsoBIおよびBstを加えないでSDA反応液を調製し、沸騰中の湯浴中で3分間これらの反応混合物を加熱することによって、標的DNA2本鎖を変性した。乾式恒温槽中で55℃において3分間反応混合物を平衡化し、各反応液に160単位のBsoBIお

よび25単位のBstポリメラーゼラジフラグメントを添加することによってSDAを開始した(酵素の総容量は50% V/Vグリセロールで調整して2 μ lとした)。SDAを55℃において30分間進行させた。反応中5分間隔で各反応液の少量(5 μ l)を取り、5 μ lの配列停止溶液に添加してSDA反応を停止した。全ての試料を採取したら、沸騰中の湯浴中で3分間インキュベーションし、各試料の5 μ lを8%ポリアクリルアミド、7M尿素配列決定ゲルにのせた。65Wで50分間の電気泳動後、モレキュラーダイナミクス(Molecular Dynamics)社製のホスホールイメージャー(Phosphorimager) 18 プレートをゲルに15分間露出し、イメージクオント(ImageQuant) 18 ソフトウェアを使用してホスホールイメージャー(Phosphorimager) 18 プレート上の放射性標識産物およびプローブバンドに存在する計測値を読むことによって、ゲル上の放射性標識した反応産物および未反応のプローブを定量した。

【0022】図1、2、3および4は、4つの異なるモデル標的配列の各々における4つの検出プライマーの各々の伸長について得られた結果を示す。各場合において、正しい検出プライマーの量が増幅後により大きいことによって示されるように、標的中に多型ヌクレオチドの正しい3'対形成を含有しない検出プライマーと比較したとき、標的DNA配列中の多型ヌクレオチドについて正しい対形成となる3'末端を有する検出プライマーが、DNAポリメラーゼによってSDA中に主に伸長された。例えば、3'A検出プライマーは、T標的配列を含有するSDA反応液中でのみ、主に伸長された(図1)。C、GまたはA標的配列に結合した3'A検出プライマーは、実質的に伸長しなかった。SDA中に生成された伸長産物は、SDAに特徴的な全長の伸長された放射性標識DNAプローブおよびニッキングされた伸長アンプリコンを含んだ。同様に、T標的には3C、3Gおよび3T検出プライマーの伸長がほとんどまたは全くなかった(図2、3および4)。同様の結果は、標的増幅反応に他の検出プライマーの各々を使用したとき見られた(3C、3Gおよび3T検出プライマーをそれぞれ図2、3および4に示す)。すなわち、検出プライマーは、標的の多型位置における正しい3'マッチを生じる標的において主に伸長された。一方、3'末端にCを有するSDA増幅プライマーを増幅反応の検出/増幅プライマーとして使用したとき、対立遺伝子は同定されなかった(図5)。本発明によるN/N-3検出/シグナルプライマーを等温増幅反応に使用して、標的核酸配列において選択した位置に存在するヌクレオチドを同定することができるが、等温増幅反応のN/N-3検出/増幅プライマーは、対立遺伝子を効率的に識別しないことをこれらの結果は例示している。

【0023】例2

変異型の診断用ヌクレオチドが検出プライマーの3'末端から1ヌクレオチドめに位置し(N-1)、検出プライマーの全体の長さが5'末端で4ヌクレオチド短い検出/シ

グナルプライマーを合成したことを除き、例1を繰り返した。検出プライマーは、また検出プライマーの3'末端から3ヌクレオチドの位置で標的DNAと完全にマッチした。4つの検出プライマーの各々を添加して、標的配列の各々の 10^4 分子を含有するSDA反応液を分離した。先に記載するように、標的を増幅し、検出した。図6 (-1A検出プライマー)、図7 (-1C検出プライマー)、図8 (-1G検出プライマー) および図9 (-1T検出プライマー) は実験の結果を示す。全ての場合において、増幅中、検出プライマーは、変異位置に完全な対形成を含有する標的において主に伸長された。完全にマッチした検出プライマーと標的で得られたシグナルは、ミスマッチした検出プライマー/標的対のいずれで得られたシグナルより30~100倍高かった。シグナルのこの差により標的中の多型ヌクレオチドを明白に同定することができ、N-1ミスマッチがPCRアンプリコンの生成に全く影響を与えなかったKwokら(上記)によるPCRの報告結果と異なる。

【0024】N-1診断用ヌクレオチド(G)と標的のN-2に第2の診断用でないミスマッチ(A)とを有する検出/シグナルプライマーを使用して、同様の結果が得られた。この検出プライマーは、実施例1で使用した検出プライマーより5'末端が5ヌクレオチド長かった。検出プライマーを実施例1で調製した4つの別個のSDA反応の各々に添加し、診断用ヌクレオチド(C)との対形成が正しい標的に結合して主に伸長されることが見いだされた。1個だけミスマッチした標的で得られたシグナルは、2個ミスマッチした標的のいずれで得られたものより5倍以上高かったこと、およびC対立遺伝子は標的のT、GおよびA対立遺伝子から容易に識別され得たことが図10に示されている。

【0025】例3

以下の実験では、HFE遺伝子(血色素症遺伝子)および野生型対立遺伝子のエクソン4における単一ヌクレオチド多型を、本発明の検出プライマーを使用して増幅中にリアルタイムで同時に検出および識別した。野生型対立遺伝子はヌクレオチド845がGであるが、変異型はこの位置がAである。これにより、タンパク質のアミノ酸位置282は、システインからチロシンになる。

【0026】各反応混合物が本発明による2つの検出/シグナルプライマー(一方は変異型対立遺伝子に特異的で、一方は野生型対立遺伝子に特異的)を含有し、BsoBIをAvaIに代えた以外は、米国特許第5,846,726号に記載

されているようにSDAを一般に実施した。各 $100\mu\text{l}$ の反応液中の成分の最終濃度は、50 mMの K_2PO_4 (pH 7.5)、6.0 mMの MgOAc 、0.2 mMの各dTTP、dGTP、dATP、1.4 mMのdCTP αS 、5 $\mu\text{g/mL}$ のアセチル化BSA、15% (v/v)のグリセロール、400ngのサケ精子DNA、20単位のエキソクレノウBstポリメラーゼ、160単位の本soBIおよび0または 10^5 コピーの標的DNAであった。この例では、標的DNAは、野生型または変異型HFEエクソン4のDNAからクローニングしたDNAから生成したPCR産物であった。野生型HFEエクソン4のDNAは、HFE野生型遺伝子のヌクレオチド位置845にGを含有し、変異型HFEエクソン4のDNAはその位置にSNPを含有し、ヌクレオチドはAであった。各試料は、また2つの検出/シグナルプライマー(以下の配列番号1および配列番号2)、2つの未標識バンパープライマー(以下の配列番号3および配列番号4)並びに2つの未標識SDA増幅プライマー(以下の配列番号5および配列番号6)を含有した。下線を付けた配列は、標的配列との相補鎖を示す。下線が付いていない位置N-3の塩基Aは、標的配列の対応するヌクレオチドと相補的でない。この内側のミスマッチは、この検出プライマーのヌクレオチド位置845の選択性を改善する。Gは、野生型標的の位置845のGと対形成する3'末端ヌクレオチド(検出プライマーの位置N)を示す。Tは、変異型標的(G845A変異)のヌクレオチド位置845のAと対形成する3'末端ヌクレオチドを示す。斜字体で示す配列は、制限酵素認識部位(RERS)を示す。増幅プライマーでは、RERSは、SDAを進行させるニッキング部位となる。検出プライマーでは、RERSには、ドナー/消光剤染料対を形成する2つの染料が隣接する。検出/シグナルプライマーが伸長され、置換され、2本鎖になると、RERSも2本鎖になり、制限酵素によって切断され得るようになる。2本鎖の伸長産物の量を検出するために、反応産物を適当な制限酵素で処理して、検出プライマーのRERSを切断する。2本鎖の産物が切断されて、染料対が分離されると、蛍光染料は消光しない。蛍光の増加が、生成される伸長後の2本鎖検出プライマーの量の指標となる。検出プライマーが効率的に伸長されない場合には、RERSは1本鎖のままであり、制限酵素によって切断されず、蛍光染料は消光したままである。従って、蛍光の増加を検出できないということは、検出プライマーが標的において効率的に伸長されなかったことを示す。

【0027】

配列番号1 位置845のヌクレオチドGに特異的な検出プライマー(野生型)

FAM-TC CTC GAG T(dabcyl)AT GGG TGC TCC ACC AGG C* (300 nM)

配列番号2 位置845のヌクレオチドAに特異的な検出プライマー(変異型)

Rox-TT CTC GAG T(dabcyl)TA CAT GGG TGC TCC ACC AGG T* (300 nM)

配列番号3 エクソン4の第1のバンパープライマー:

CGA ACC TAA AGA CGT ATT CGG C (50 nM)

配列番号4-エクソン4の第2のバンパープライマー:

CCC CAA TAG ATT TTC TCA GCT CC (50 nM)

配列番号5-エクソン4の第1のSDA増幅プライマー:

ACC GCA TCG ATT GCA TGT CTC GGG CTG GAT ACC CTT GGC T

配列番号6-エクソン4の第2のSDA増幅プライマー:

CGA TTC CGC TCC AGA CTT CTC GGG AGA TCA CAA TGA GGG GCT GA

【0028】各SDA反応物は、上記に示すように各々異なる蛍光団で標識した2つの検出プライマーを含んだ。反応物は、BstおよびBsoBI以外の全ての試薬を含有するようにマイクロウェル中で調製し、加熱変性し、55℃に平衡させ、酵素を添加することによって増幅を開始した。マイクロウェルを密封し、温度制御を可能にするように改良したサイトフローア (Cytotfluor) IITM内に置いた。バンドパスフィルターを使用して、フルオレセインに特徴的な1つの波長範囲 (475~495 nm) およびROXに特異的なもう1つの範囲 (635~655 nm) までの励起に制限した。各ウェルについて、45秒ごとに1回のフルオレセイン読みおよび1回のROX読みを実施した。反応は、一般に、90分間モニターした。対照の反応は、標的DNAを含有しなかった。

【0029】結果を図11、12および13に示す。野生型エクソン4のDNAから誘導した標的だけを含有する試料では (図11)、蛍光はフルオレセインに特徴的な発光範囲 (FAM、520~540 nm) において経時的に強く増加した。これは、配列番号1の検出プライマーはこの標的において効率的に伸長されたことを示しており、野生型対立遺伝子の存在を同定している。一方、野生型エクソン4試料では、ROXに特徴的な発光蛍光 (635~655 nm) は低いままであり、配列番号2の検出プライマーは増幅中に標的に結合して効率的に伸長されなかったことを示しており、変異型対立遺伝子が存在しないことを確認している。一方、変異型エクソン4のDNAから誘導されたDNAを含有し、野生型DNAを含有しない試料では、蛍光プロフィールは逆であった (図12)。これらの試料では、蛍光はROXの発光波長が強力に増加したが、FAM波長は増加せず、変異型対立遺伝子が存在し、野生型対立遺伝子が存在しないことを示している。野生型および変異型DNAを共に含有する試料では、蛍光はモニターした両方の範囲で増加し、試料中に両方の対立遺伝子が存在することを示している (図13)。

【0030】同様の実験において、野生型対立遺伝子に特異的な別の検出プライマーを試験し、その性能を配列番号1の検出プライマーと比較した。別の検出プライマーは、N-2に診断用ヌクレオチドと、N-3に第2の診断用でないヌクレオチドを有した (N-2/N-3検出プライマ

ー; FAM-TC CTC GAG T(dabcyl)AT GGG TGC TCC ACC TGA C*AC; 配列番号14)。また、増幅プライマー配列番号5を配列番号15 (ACG CAG CAG CAC ACA TTC TCG GGG AAG AGC AGA GAT ATA CGT) と交換した。配列番号14を使用して、一方は野生型標的だけを含有し、他方は変異型標的だけを含有する2つの試料を試験した。各試験反応物は、野生型対立遺伝子を検出するための配列番号14と変異型対立遺伝子を検出するための配列番号2を含有した。配列番号1/配列番号2検出プライマー系は、対照反応として作用した。フルオレセインおよびローダミンの両蛍光をモニターし、各試料の蛍光読み値をプロットした。野生型標的を含有する試料では、N-2/N-3検出プライマーが変換され、フルオレセイン発光が3倍増加した。変異特異的検出プライマーは未変換のままで、ローダミン発光は本質的に変化しなかった。変異型標的だけを含有する試料では、パターンは逆であった。フルオレセイン発光が変化しなかったことによって示されるように、N-2/N-3検出プライマーは変換されなかったが、変異型特異的検出プライマーからのローダミン発光は、約3倍増加した。この結果を対照反応と比較すると、配列番号14の標的特異性は配列番号1の標的特異性とほぼ等しいことが実証される。

【0031】配列FAM-TA GCA GTC CCG AGA CTG CT(dabcyl)A TGG GTG CTC CAC CAG GC*)を有する野生型特異的な検出プライマーは、配列番号1より野生型対立遺伝子の検出感度が高いが、特異性がわずかに低い。

【0032】例 4

HFE遺伝子のエクソン2に特異的な増幅プライマーとエクソン2の野生型および変異型対立遺伝子を検出および同定するための検出/シグナルプライマーの対を使用した以外は、例3の実験プロトコルを繰り返した。野生型対立遺伝子は、ヌクレオチド187がCである。変異型対立遺伝子は、この位置にGを有するので、タンパク質のアミノ酸63位はヒスチジンがリジンになる。これらの検出プライマーは、エクソン2の非コード鎖に含有される対立遺伝子にハイブリダイゼーションするように設計された。

【0033】

配列番号7 ヌクレオチド位置187の野生型対立遺伝子の検出プライマー (C187、すなわち、相補鎖のG) :

FAM-TC CTC GAG T(dabcyl)TA CCA GCT GTT CGT GTT CTA TGA TC* (300 nM)

配列番号8 ヌクレオチド位置187の変異型対立遺伝子の検出プライマー (G187、すなわち、相補鎖のC) :

Rox-TA CCG CAC T(dabcyl)GA TTA CCA GCT GTT CGT GTT CTA TAA TG* (300 nM)

配列番号9-エクソン2の第1のバンパープライマー:

TGA ACA TGT GAT CCC ACC CT (50 nM)

配列番号10-エクソン2の第2のバンパープライマー:

CCC CAA TAG ATT TTC TCA GCT CC (50 nM)

配列番号11-SDAの第1の増幅プライマー:

ACC GCA TCG AAT GCA TGT CTC GGG AGC TTT GGG CTA CGT GGA TG

配列番号12-SDAの第2の増幅プライマー:

CGA TTC CGC TCC AGA CTT CTC GGG GCT CCA CAC GGC GAC TCT

【0034】配列番号7は、標的との診断用でないミスマッチを含有しなかった。伸長された2本鎖検出プライマー産物が形成される結果ROX/Dabcyl染料対は消光しないので、配列番号8はRERSを含有しなかった。制限酵素による切断は、蛍光の増加を観察するのに必ずしも必要ではない。

【0035】野生型または変異型エクソンのどちらから誘導された10⁷ コピーの標的DNAを含有するSDA反応の結果を図14、15および16に示す。野生型エクソン2のDNAだけから誘導された標的を含有する試料では(図14)、フルオレセインの発光波長範囲の蛍光が経時的に強く増加し、野生型対立遺伝子の存在を示している。また、これらの試料ではローダミンの発光波長範囲の蛍光は、低いままで、変異型対立遺伝子が存在しないことを示している。一方、変異型エクソン2からだけ誘導されたDNAを含有する試料では、蛍光プロフィールは逆であった(図15)。この場合には、ROX蛍光が強く増加し、FAM蛍光は低いままであった。野生型および変異型DNAの両方を含有する試料では(図16)、両蛍光団の蛍光は強く増加し、1つの試料中に両方の対立遺伝子が存在することを示している。

【0036】また、反応においてCGA TAC GCT CCT GAC TTC TCG GGA CAA ACG GCG ACT CTCAT (配列番号17)を有する増幅プライマーと配列番号12を交換することによって、エクソン2標的の増幅効率がよりよくなる。さらに、配列Rox-TA GCG CCC GAGCGC T(dabcyl)AT GTT CGT GTT CTA TGA TC*A (配列番号18)を有するN-1検出プライマーは、別の増幅プライマー配列番号17と併用して使用される場合には、対立遺伝子識別を改善する。

【0037】例5

この例は、核酸増幅反応において多数の対立遺伝子特異的プローブの交差反応性を調整するために検出プライマーに、5' 末端配列を使用することを例示する。この例はSDAを使用した、2つの対立遺伝子を識別するための標識プローブまたはプライマーの伸長に係るPCR、NASBA、3SR等を含む、当技術上周知の他の増幅方法でも同様の結果が予測される。

【0038】例3および4は、一方は野生型対立遺伝子に特異的で、他方は変異型対立遺伝子に特異的である2つの異なって標識された検出/シグナルプライマーを含有するSDA反応を記載している。従って、各反応混合物は、変異型対立遺伝子、野生型対立遺伝子または両対立

遺伝子を同時に検出することができる。どちらかの対立遺伝子について1つの試料を分析できることは、試料を分割し、1検出プライマーアッセイを2つ別個に実施する別の方法より簡便で、信頼性があり、少量の試料しか必要としない。しかし、2つ以上の異なる標識の検出プライマーを含有する反応混合物中では、第2の検出プライマーの標識が存在する場合には、一方の検出プライマーによって、多量の偽の交差反応シグナルが形成されることがある。この交差反応性は、両方の検出プライマーが同時に存在することによって生じ、または悪化するが、1検出プライマー反応混合物中では、交差反応性は低下するか、または消失すると出願人らは考えている。2つの検出プライマーの5' 末端配列が実質的に異なるように、検出プライマーを設計することによって、このような多数の検出プライマー反応混合物中で交差反応性を実質的に低下することができることが発見された。5' 末端は元の標的配列に相補的でなく、対立遺伝子特異的ヌクレオチドは、検出プライマーの5' 末端から離れた位置または3' 末端近傍に位置するので、この結果は予測されなかった。

【0039】図17は、例としてSDAを使用したとき、この予測されなかった交差反応の原因と思われるものを例示する。図示した「野生型」標的は診断されるヌクレオチド位置にCを含有する。従って、示すように、この対立遺伝子の検出プライマーは、3' 末端Gを含有する。これを例示する目的のために、「変異型」対立遺伝子(示していない)は診断位置にTを含有し、その検出プライマーは3' 末端Aを含有する。両方の検出プライマーが増幅反応中に存在する。増幅中、C-特異的検出プライマーは標的にハイブリダイゼーションし、伸長され、2本鎖に変換され、切断可能になって、ドナー/消光剤染料対を分離する。得られた蛍光の増加は、Cを含有する標的が存在することを示す。次いで、残りの2本鎖種は、ニッキング可能な制限部位を含有するので、直線の増幅を受ける。直線の増幅は、診断位置にCを含有する1本鎖種を生成する。次いで、2つの別の反応経路が可能である。1つの場合では、前のように、直線増幅産物が適当なC特異的検出プライマーにハイブリダイゼーションし、切断された産物に変換され、C特異的シグナルをさらに増強することができる。または、直線増幅反応産物がT特異的検出プライマーに擬似的にハイブリダイゼーションすることがある。T特異的検出プライマーの3' 末

端の1個のミスマッチは、このような誤ったハイブリダイゼーションを防ぐには十分ではないと思われる。しかし、T特異的検出プライマーおよびC特異的検出プライマーの5'末端配列が同一である場合には、ハイブリダイゼーションが起き、擬似的にハイブリダイゼーションしたT特異的検出プライマーは、A:Cミスマッチを伸長させることなく、切断された蛍光産物に速やかに変換されると思われる。これにより、診断位置にTヌクレオチドが存在することを誤って示すシグナルが形成される。しかし、T特異的検出プライマーおよびC特異的検出プライマーが異なる5'末端配列を含有する場合には、5'末端は直線増幅産物にハイブリダイゼーションすることによって、2本鎖形態に変換されることができないので、擬似的にハイブリダイゼーションしたT特異的検出プライマーは切断を受けない。検出プライマーは、野生型標的に誤ってハイブリダイゼーションしても、切断されないままなので、偽陽性シグナルは形成されないと思われる。示した例では、5'末端配列の残りが異なった場合には、2つの検出プライマーが同じ制限部位を持つということだけでは、末端をハイブリダイゼーションさせるのに十分でないと思われる。

【0040】図17はSDAにおいて偽陽性シグナルを擬似的に形成する機序を例示しているが、同様の反応は他の増幅方法において生じる。PCR、NASBA、3SR、TMAまたは任意の他の増幅反応においてCを含有する1本鎖検出プライマー伸長産物が形成されるときは、常に、それはC特異的検出プライマー（正しい）またはT特異的検出プライマー（正しくない）にハイブリダイゼーションする。2つの検出プライマーが同じ5'末端配列を有する場合には、伸長産物はどちらか一方の5'末端と相補的であり、RERSは2本鎖で、切断可能である。2つの検出プライマーが異なる5'末端配列を有する場合には、検出プライマーが正しくない標的にハイブリダイゼーションすると、2本鎖RERSが形成されず、偽陽性シグナルは形成されない。

【0041】この現象を例示するために、4つのSDA反応物を調製した。全ての反応物は変異型特異的検出プライマー配列番号2（300nM）を含有した。反応物1および2は、配列番号2と同一の5'末端配列を有する野生型に特異的な配列番号13（FAM-TT CTCGAG T(dabcyl)TA CAT GGG TGC TCC ACC AGG C*（300 nM）を含有した。反応物3および4は、5'末端配列が、RERS（CTCGAG）以外は配列番号2と異なり、フルオレセイン標識した野生型特異的検出プライマー配列番号1（300 nM）を含有した。反応混合物はまた、HFE遺伝子のエクソン4から誘導した野生型（反応物1および3）または変異型（反応物2および4）標的DNA（反応物あたり10⁵コピー）を含有した（例3参照）。フルオレセインの蛍光発光だけを検出した以外は、例3と同様に反応を実施した。

【0042】結果を図18に示す。反応物1はフルオレセ

インの蛍光が強く増加し、標的中に野生型対立遺伝子の存在を示す。変異型DNAだけを含有する反応物2は、野生型が存在しないが、蛍光は小さいが、実質的に増加した。反応物に存在する2つの検出プライマーの5'末端配列が同一であったので、おそらく図17に例示する機序によって、このシグナルは野生型「特異的」検出プライマーの擬似的な変換を示した。野生型検出プライマーの5'末端を変更したとき（配列番号1）、標的的特異的シグナルに実質的に影響を与えることなく（反応3）、交差反応によるシグナルは抑えられた（反応4）。

【図面の簡単な説明】

【図1】診断用3'末端ヌクレオチドおよびN-3の診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例1の結果を示す。

【図2】診断用3'末端ヌクレオチドおよびN-3の診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例1の結果を示す。

【図3】診断用3'末端ヌクレオチドおよびN-3の診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例1の結果を示す。

【図4】診断用3'末端ヌクレオチドおよびN-3の診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例1の結果を示す。

【図5】診断用3'末端ヌクレオチドおよびN-3の診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例1の結果を示す。

【図6】N-1の診断用ヌクレオチドおよび診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例2の結果を示す。

【図7】N-1の診断用ヌクレオチドおよび診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例2の結果を示す。

【図8】N-1の診断用ヌクレオチドおよび診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例2の結果を示す。

【図9】N-1の診断用ヌクレオチドおよび診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例2の結果を示す。

【図10】N-1の診断用ヌクレオチドおよび診断用でないミスマッチを用いたモデル標的システムおよび検出プライマーを使用して、SNPを検出し、同定する例2の結果

を示す。

【図 1 1】HFE遺伝子のエクソン4の2つの対立遺伝子をリアルタイムで同時に検出し、同定する例3の結果を示す。

【図 1 2】HFE遺伝子のエクソン4の2つの対立遺伝子をリアルタイムで同時に検出し、同定する例3の結果を示す。

【図 1 3】HFE遺伝子のエクソン4の2つの対立遺伝子をリアルタイムで同時に検出し、同定する例3の結果を示す。

【図 1 4】HFE遺伝子のエクソン2の2つの対立遺伝子をリアルタイムで同時に検出し、同定する例4の結果を示す。

【図 1 5】HFE遺伝子のエクソン2の2つの対立遺伝子をリアルタイムで同時に検出し、同定する例4の結果を示す。

【図 1 6】HFE遺伝子のエクソン2の2つの対立遺伝子をリアルタイムで同時に検出し、同定する例4の結果を示す。

【図 1 7】増幅反応の多数の検出プライマーが同一の5'末端配列を有する場合に偽陽性を発生する可能性のある機序を例示する。

10 【図 1 8】多数の検出プライマーが同一または異なる5'末端配列を有する場合に、反応における多数の検出プライマーの性能を比較する例5の結果を示す。

SEQUENCE LISTING

<110> Wright, David J.
Milla, Maria A.
Nadeau, James G.
Walker, G. Terrance

<120> Methods for Detecting Nucleic Acid Sequence Variations

<130> 12-269

<140> JP P2000-182884

<141> 2000-06-19

<150> US09/335218

<151> 1999-06-17

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

tcctcgagta tgggtgctcc accaggc

27

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ttctcgagtt acatgggtgc tccaccaggt

30

<210> 3

<211> 22

23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
1

<400> 3
cgaacctaaa gacgtattcg gc 22

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 4
ccccaataga ttttctcagc tcc 23

<210> 5
<211> 40
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 5
accgcatcga ttgcatgtct cgggctggat acccttggct 40

<210> 6
<211> 44
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 6
cgattccgct ccagacttct cgggagatca caatgagggg ctga
44

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 7
tcctcgagtt accagctgtt cgtgttctat gatc 34

<210> 8
<211> 37
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 8
taccgcactg attaccagct gttcgtgttc tataatg 37

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

25	26
<400> 9	
tgaacatgtg atccccacct	20
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
ccccaataga ttttctcagc tcc	23
<210> 11	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
accgcatcga atgcatgtct cgggagcttt gggctacgtg gatg	44
<210> 12	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 12	
cgattccgct ccagacttct cggggctcca cacggcgact ct	42
<210> 13	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
ttctcgagtt acatgggtgc tccaccaggc	30
<210> 14	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
tcctcgagta tgggtgctcc acctgacac	29
<210> 15	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
acgcagcagc acacattctc ggggaagagc agagatatac gt	42

27

28

<210> 16
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 tagcagtcctc gagactgcta tgggtgctcc accaggc

37

<210> 17
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 cgatagcttc ctgacttctc gggacaaacg gcgactctca t

41

<210> 18
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

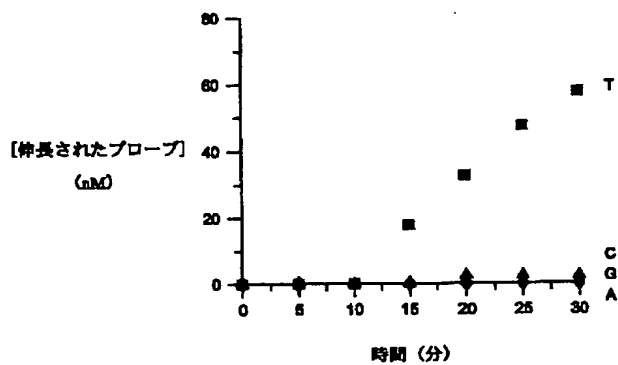
<400> 18
 tagcgcccca gcgctatgtt cgtgttctat gatca

35

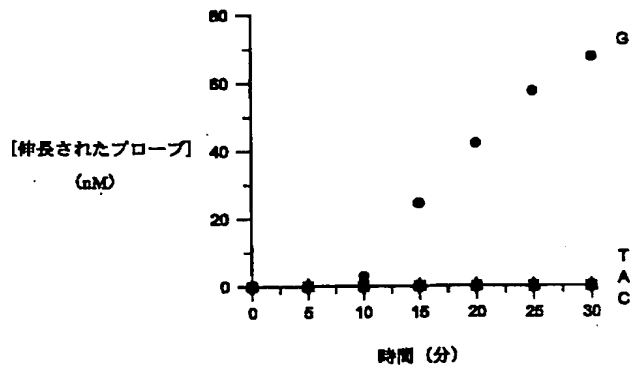
【図 1】

【図 2】

3A/3'A 検出プローブ

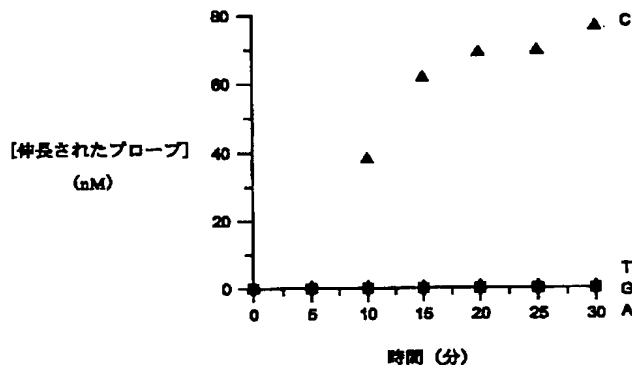


3A/3'C 検出プローブ



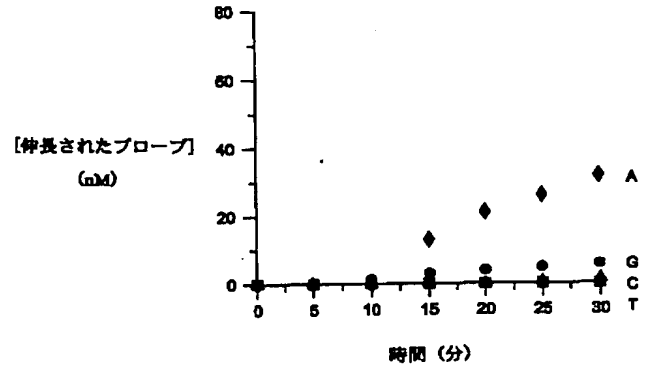
【図 3】

3A/3G 検出プローブ



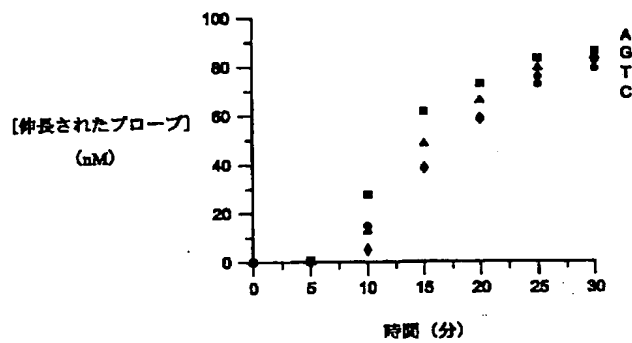
【図 4】

3A/3T 検出プローブ



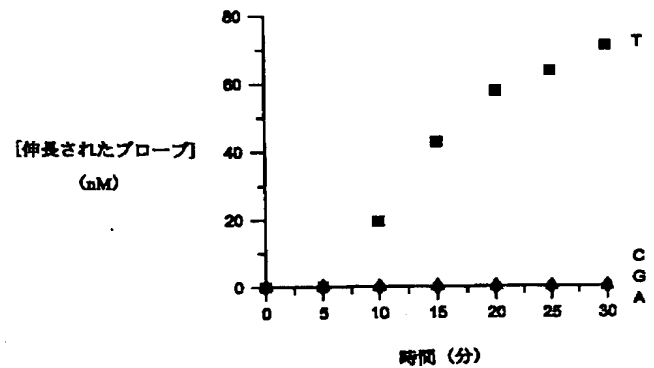
【図 5】

10,000 の A、C、G または T 標的を用いた S1.1/2.2 SDA



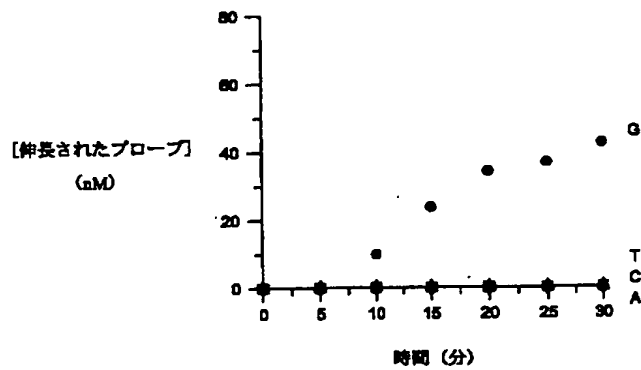
【図 6】

1A 検出プローブ



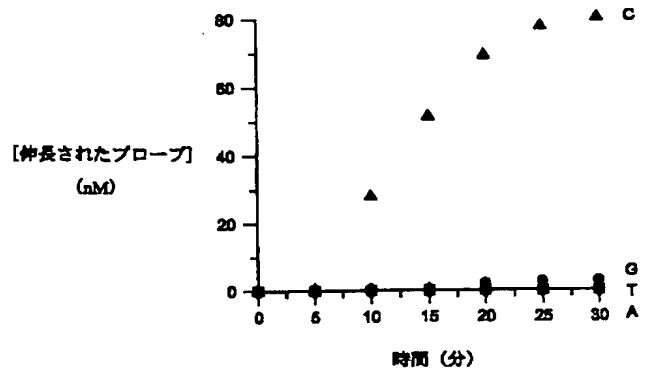
【図 7】

1C 検出プローブ



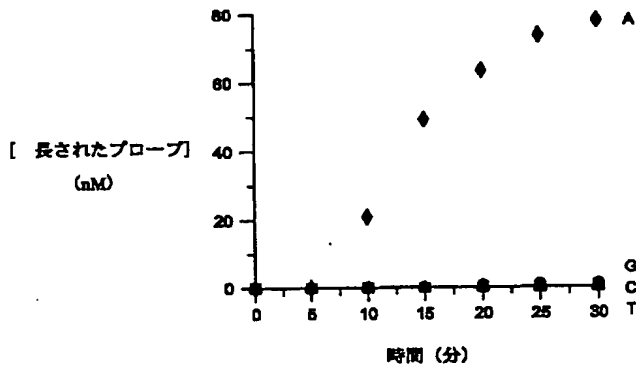
【図 8】

1G 検出プローブ



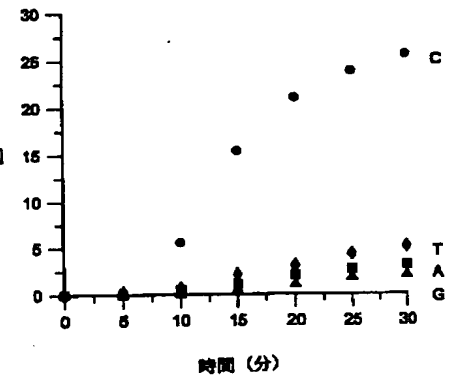
【図9】

1T検出プローブ



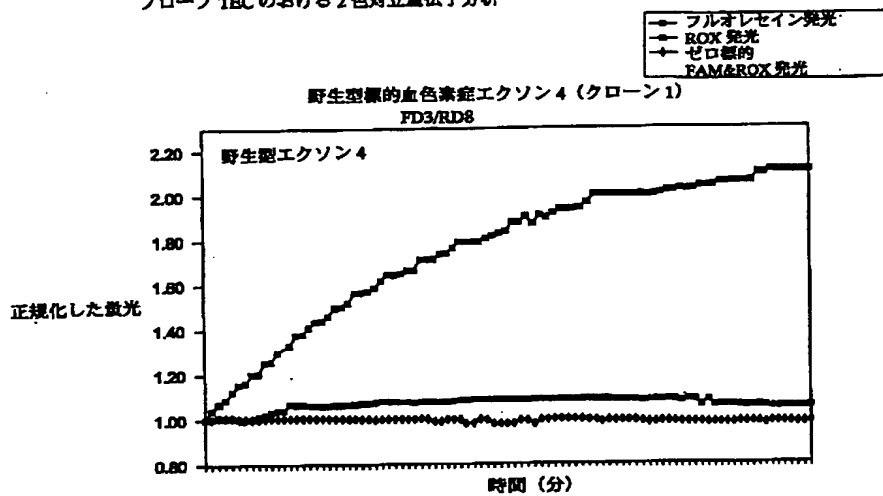
【図10】

10,000のA、C、GまたはT額約を用いたSDAにおけるNP-6検出プローブ

【伸長されたプローブ】
(nM)

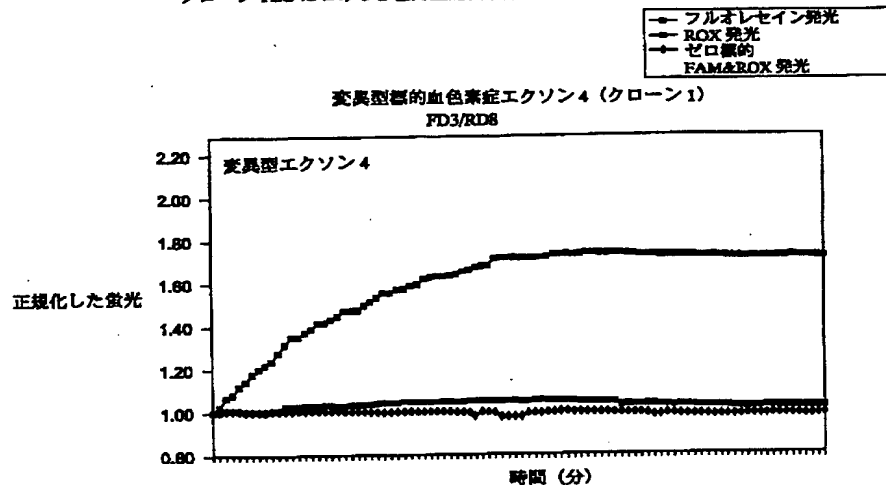
【図11】

プローブTECにおける2色対立遺伝子分析



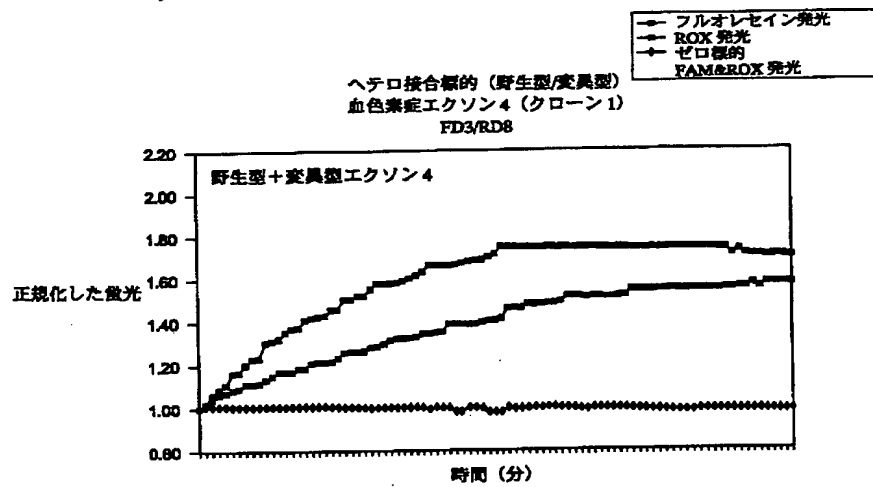
【図12】

プローブTBCにおける2色対立遺伝子分析



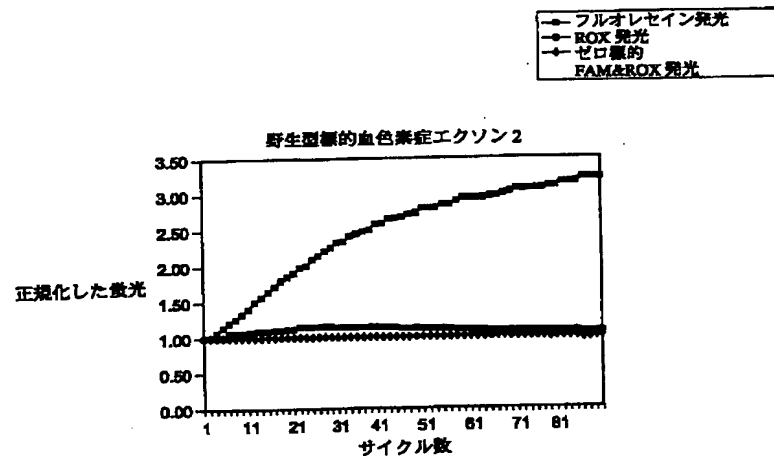
【図13】

プローブTBCにおける2色対立遺伝子分析



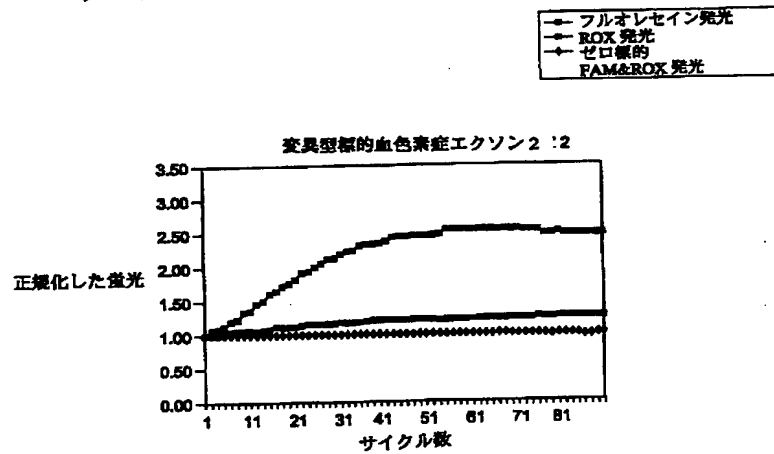
【図14】

プローブTBCでの2色SNP分析



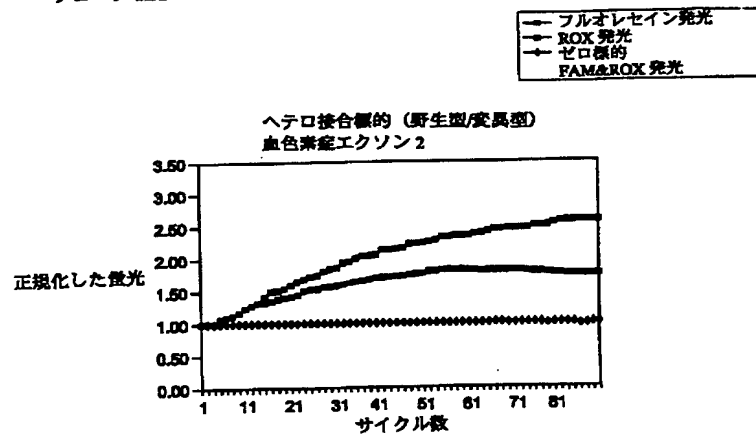
【図15】

プローブTBCでの2色SNP分析

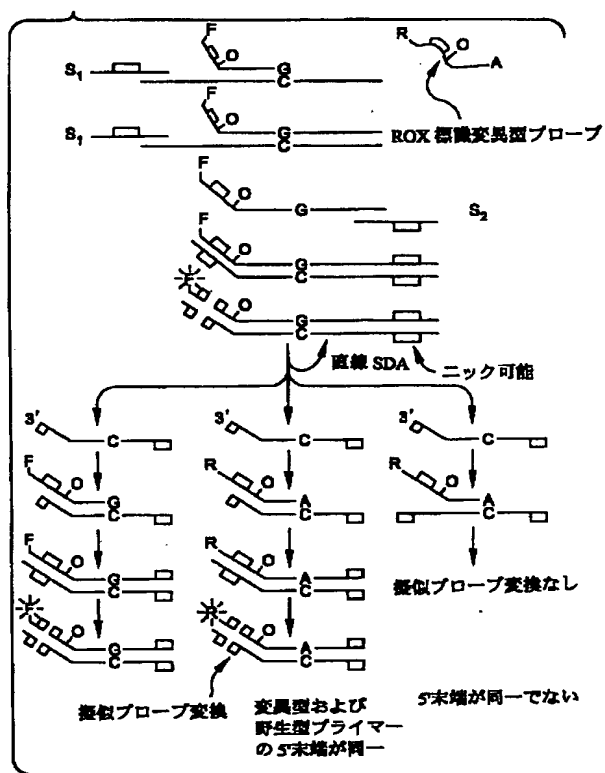


【図16】

プローブTBCでの2色SNP分析

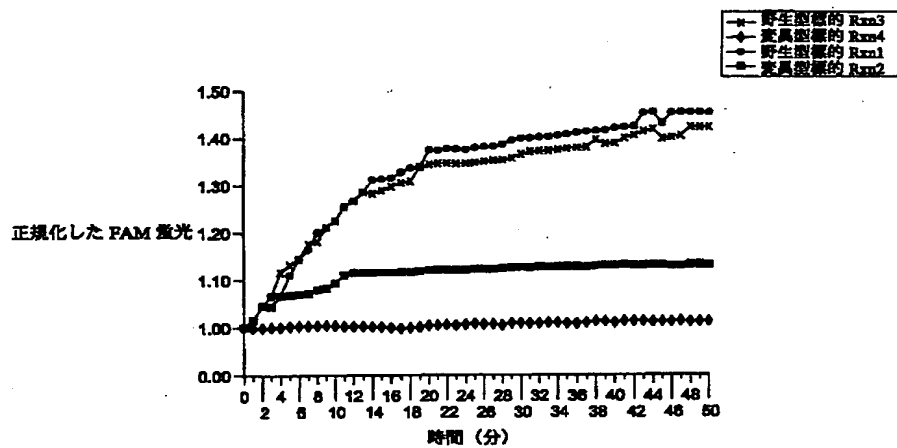


【図17】



【図18】

SDA HH4 系 105 標的、300nm の FAM 検出プローブ



フロントページの続き

(71)出願人 595117091

1 BECTON DRIVE, FRA
NKLIN LAKES, NEW JE
RSEY 07417-1880, UNITED
STATES OF AMERICA

(72)発明者 デイヴィッド・ジェイ・ライト

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27514,
チャペル・ヒル, マウント・カーメル・チ
ャーチ・ロード 1013

(72)発明者 マリア・エイ・ミラ

アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州19096,
ウィンウッド, デルモント・ドライブ 86
7

(72)発明者 ジェイムズ・ジー・ナデュー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27514,
チャペル・ヒル, コーカー・レイン 710

(72)発明者 ジー・テレンス・ウォーカー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27514,
チャペル・ヒル, マウント・ボーラス・ロ
ード 203